

# Single-cell Multi-omics Enables Granular Resolution Into AML For Powerful Insight Into the Correlation Between Genotype and Phenotype

## Takeaways

- Tapestri Platformは、同一のシングルセルからSNVとCNV、さらにタンパク質発現を、一度に検出できる唯一のシングルセルマルチオミクスプラットフォームです。
- バルクシーケンス、培養細胞株データベース及びフローサイトメトリーによって、Tapestri Platformのマルチオミクス解析結果を検証しました。
- Tapestri Platformは、培養細胞株及び血液サンプルのマルチオミクス解析を実現します。

おり、バルクシーケンス法では定義できないことを示しています。また、Tapestri Platformのマルチオミクスデータは、AMLサンプルの解析でゴールドスタンダードとなっているオミクス技術で得られたデータと一致しました。これらの結果は、AMLの様々な細胞状態を説明・定義するという、Tapestri Platformのシングルセルマルチオミクス解析の能力を示しています。

## Experiment & Methods

ペンシルベニア州立大学のDr. Saar Gill研究室との共同研究において、不均一なAMLサンプルを模擬実験するために、AML細胞株であるTHP-1、MOLM14、OCI-AML-3、Kasumi及びHEL92.1.7を同じ割合で混合し、Tapestri PlatformでSNV、indel、CNV及びタンパク質を解析しました。Tapestri Platformで細胞のタンパク質発現を解析するために、CD33、CD34、CD38、CD110、CD117、CD123及びCD135を標的とする、バーコード付き抗体を使用しました。

## Abstract

現代医学は、急性骨髄性白血病（AML）などの疾患の治療に、多くの選択肢を与えています。がんは様々な状態の細胞からなる不均一な細胞集団であることから、個々の患者さんに最適な治療を施すには、細胞レベルで疾患を理解する必要があります。遺伝子型と表現型の相互作用を明らかにするシングルセルマルチオミクス解析は、細胞レベルで疾患を詳細に説明する唯一の方法です。本アプリケーションノートにおいて、シングルセルマルチオミクスプロファイリングによって細胞亜集団を包括的に明らかにするという、Tapestri Platformの能力を紹介します。このプラットフォームでAML細胞株の混合サンプル及びAML臨床検体を解析し、一塩基多型（SNV）とコピー数多型（CNV）、そして細胞表面タンパク質の発現をシングルセルレベルで検出しました。この結果は、細胞の分集団が一つの遺伝子的又は表現型的な因子のみで一貫して定義されているのではなく、複数の因子によって定義されて

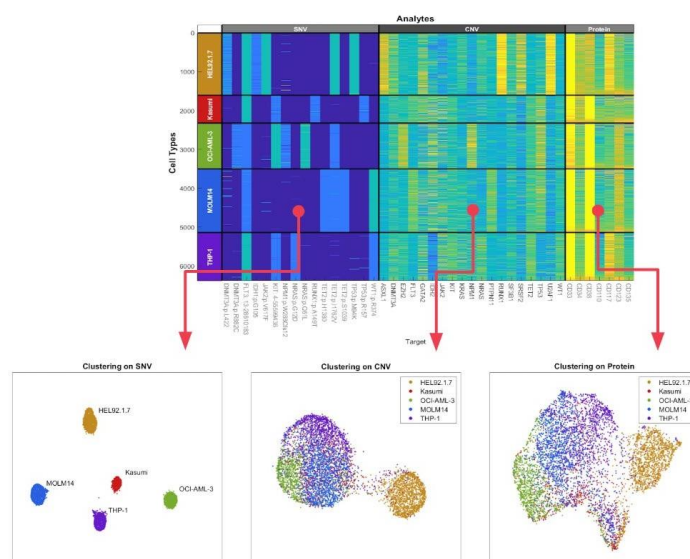


Figure 1 – 5種類のAML細胞株を混合したサンプルから得たSNV、CNV及びタンパク質発現データのヒートマップとt-SNEプロット。各培養細胞株で過去に確立されたSNV遺伝子型に基づいて、t-SNEを着色しました。

次に、国立心肺血液研究所（NHLBI）Dr. Chris Houriganの研究室との共同研究において、AMLサンプルのDNAとタンパク質をTapestri Platformで解析しました。この解析において、45アンプリコンからなるTapestri Custom DNA Panel Kitと、6種類のバーコード付き抗体（CD3, CD11b, CD19, CD34, CD38及びCD90）を使用しました。このカスタムDNAパネルには、AMLで知られているCNVのある、7番染色体が含まれていました。Tapestri Pipeline Softwareでデータ解析を行いました。Tapestri Insights SoftwareでSNV及びindelを同定し、Mission Bioの「tapestri-cnv」（Rパッケージ用）でCNV解析を行いました。そして、Mission Bioの「tapestri-protein」（Rパッケージ用）で、DNAとタンパク質データを統合して解析を行いました。

## Results

### Single-cell multi-omics of mixed AML cell lines reveals variable clustering on different analytes

同じ割合で混合したAMLサンプルからSNVとCNV、タンパク質データを取得し、ヒートマップ及びt-SNEをプロットしたところ、5種の培養細胞株の分離パターンは多様でした（Figure 1）。SNVデータは培養細胞株を厳密に分離しましたが、これは培養細胞株の遺伝子型から期待されたとおりでした。CNV又はタンパク質データの場合、培養細胞株はよく分離されませんでした。このことは、不均一な細胞集団の解明において、一種類のデータでは情報量が不十分であることを示しています。いくつかのサンプルでは、極めて似た遺伝子型を持ちながらもタンパク質発現パターンが異なる細胞が含まれていることがあります。Tapestri Platformのシングルセルマルチオミクス解析は、こうした不均一なサンプル内の細胞分集団を効率的かつ強力に解明します。

### Tapestri multi-omics results verified using gold-standard pathology methods

Tapestri Platformのシングルセルマルチオミクス解析の信頼性を実証するために、その結果を、AMLサンプルの一般的な解析法である、フローサイトメトリー解析と比較しました。AML細胞株の混合サンプルに対するマルチパラメーターフローサイトメトリー解析の結果は、同じタンパク質について、Tapestri Platformの結果と強く相関しました（Figure 2）。

この混合サンプルのバルクシーケンス解析の結果は、シングルセル解析で同定された16変異のうち15の変異について、Tapestri Platformの結果と強く相関しました。CNV解析の結果を確認するために、Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)1 と照合したところ、HEL92.1.7細胞株において、RUNX1及びU2AF1遺伝子で既知の獲得性変異を同定しました。これらの結果は、Tapestri Platformで得たSNV、CNV及びタンパク質データが、確立された一般的な手法と十分に相関することを示しています。

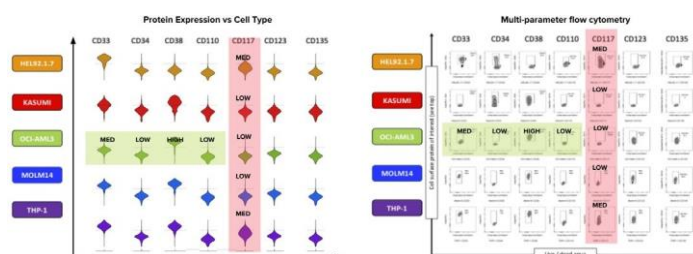


Figure 2 – AML細胞株の混合サンプルにおけるタンパク質発現データの比較（左がTapestri Platformで右がフローサイトメトリー）。両者の強い相関を示しています。

### AML subpopulation identified through single-cell protein analysis, unresolved through SNV or CNV

AML臨床検体において、合計5,000以上の細胞をシーケンスして解析しました。

SNV、CNV又はタンパク質データのクラスタリング解析結果をt-SNEで可視化したところ、細胞分集団の分離パターンは様々でした。タンパク質によるクラスタリングで最もよく分離され、4種の細胞分集団が識別されました。それらのうち2種は、それぞれCD3又はCD19で陽性であり、T細胞（0.6%）及びB細胞（3.4%）でした。残りの2集団は腫瘍性であり、一方はCD11b陽性（3.6%）、もう一方は陰性でした（95%）。興味深いことに、SNVのみでのクラスタリングは、正常と腫瘍の2種の集団にしか分離しませんでした。このことは、遺伝子型は表現型と直接相関しないことを示しています。腫瘍性集団における数遺伝子のコピー数の欠失をヒートマップで確認しましたが、CNVによるクラスター分類は限定的でした（Figure 3）。

さらなる解析によって、野生型タンパク質マーカー (CD3, CD19) は野生型の遺伝子型と正の相関すること、造血系のマーカーであるCD11b及びCD34は腫瘍性の遺伝子型と相関することを明らかにしました (Figure 3b)。また、疾患関連性と思われるASXL1 G646Vヘテロ接合性SNVが腫瘍性の細胞集団で同定されました。

タンパク質発現データで正常及び腫瘍性の集団を同定できたことから、次に集団間のCNVを定量しました (Figure 3b)。AMLにおいて、7番染色体におけるdeletionは、高頻度に認められる特徴であり、疾患に関連しています。このサンプルにおいても、多くの遺伝子に影響を及ぼすdeletionを7番染色体に認めました。SNVデータは、7番染色体で認められた遺伝子のLOHを示すCNVデータを裏付けました。すなわち、いくつかの遺伝子において、正常細胞でヘテロ接合性であった変異が腫瘍細胞で野生型にシフトしていました。さらに、4番染色体のTET2遺伝子が野生型のままであったにもかかわらず、CNVデータはTET2のコピー数の欠失を明らかにしました。

## Conclusion

遺伝子型及び表現型をシングルセルレベルで解析することによって、不均一なサンプル内に存在する、様々な細胞集団を明らかにすることが可能です。これにより、従来のバルク解析では得られなかった情報を得ることができます。マルチオミクス解析は、遺伝子型と表現型を対象とすることで、重要な細胞分集団を定義することができます。シングルセルデータの統合は、腫瘍性細胞の分集団をよく分離し、個々のデータで得た結論を強力に支持します。

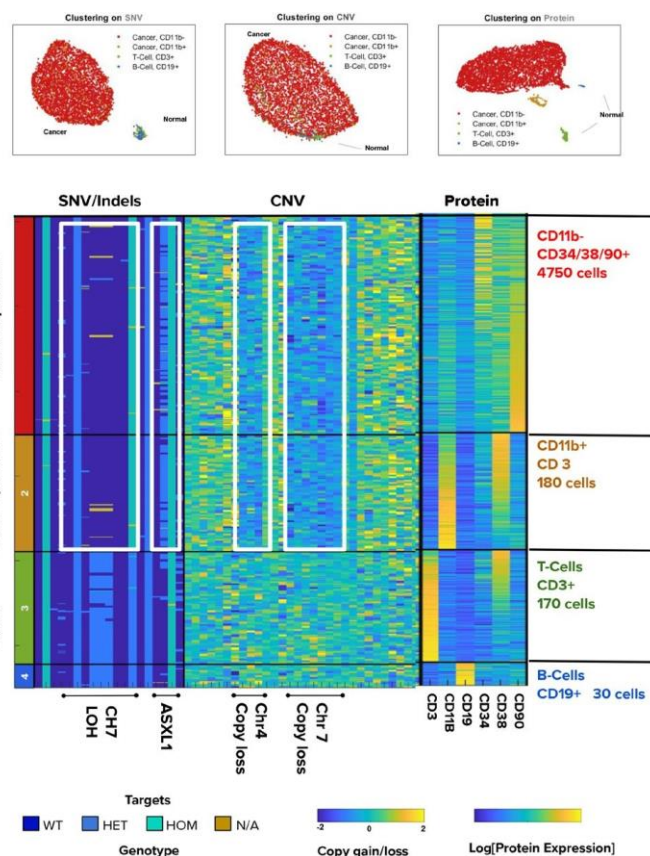


Figure 3 – AML臨床検体で得たSNV/indel及びタンパク質データの教師なしクラスターリングをt-SNEプロット (a) 及びヒートマップ (b) で可視化。遺伝子型と比較して、タンパク質発現データは厳密に細胞亜集団を分離しました。タンパク質発現で同定した亜集団に基づいて、t-SNEを着色しました。

## References

<https://www.nature.com/articles/nature11003#citeas>